

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 10 月 4 日 (04.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/72968 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 1/14, 3/00 // (C12N 1/14, C12R 1:885) (C12N 3/00, C12R 1:885)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/02772
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 30 日 (30.03.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-98293 2000 年 3 月 31 日 (31.03.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社北海道グリーン興産 (HOKKAIDO GREEN KOSAN, INCORPORATED) [JP/JP]; 〒060-0001 北海道札幌市中央区北1条西18丁目1番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 佐々木康晴 (SASAKI, Yasuharu) [JP/JP]; 〒060-0042 北海道札幌市中央区大通西18丁目1番地3 オリンピア大通西18丁目マンション702号 Hokkaido (JP).
- (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木進 (SASAKI, Susumu) [JP/JP]; 〒060-0001 北海道札幌市中央区北1条西19丁目2番地 ファミール第2大通り 802号 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 鈴木正次, 外 (SUZUKI, Shoji et al.); 〒160-0017 東京都新宿区左門町16-2 日本生命四谷ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, ID, IL, IN, JP, KR, LK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, US, VN, ZA.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHLAMYDOSPORES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 厚膜孢子及びその製造方法

(57) Abstract: It is intended to effectively produce a large amount of chlamydospores of *Trichoderma herzianum* SK-55 mycelia. This object is achieved by chlamydospores characterized by having been obtained by inoculating a culture medium containing glucose, yeast extract and polypeptone with *Trichoderma herzianum* SK-55 mycelia and culturing the same to thereby obtain chlamydospores containing conidiospores.

(57) 要約:

この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体の厚膜孢子の効率的な多量生産を目的としたものである。トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、培養し、分生子入りの厚膜孢子を得たことを特徴とする厚膜孢子によりその目的を達成したものである。

WO 01/72968 A1



## 明 細 書

### 厚膜孢子及びその製造方法

#### 5 技術分野

この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55の厚膜孢子又は菌糸体、分生子及び厚膜孢子の混合物を多量生産することを目的とした厚膜孢子及びその製造方法に関する。

10 なお、この発明で用いるトリコデルマ ハルジアナム SK-55菌は、日本国経済産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）（生命研）に受託番号「微工研菌寄第13327号」として寄託されている（受託の日：1992年12月9日、受託者：株式会社北海道グリーン興産）。当該原寄託からのブダベスト条約に基づく寄託への移管請求は、1992年12月9日付で行なわれ、受託番号BP-4346が付与されている。

15

#### 背景技術

従来菌糸体微生物には、微量の厚膜孢子が含まれていることが知られていた。前記厚膜孢子は、環境対応性が高く、低温はもとより、高温においても死滅しないことが知られていた。またニンビア スシルビコラK-004（FERM B  
20 p-4448）の厚膜孢子及びその誘導培地に関する発明の提案がある（特開平7-303481号）。

前記に示した天然に存在する厚膜孢子は、極めて微量である為に、これを集めて使用することは困難である。また前記公知発明に示された培地では、一般的菌糸体微生物の厚膜孢子を効率よく多量生産することはむづかしい問題点があった

25

#### 発明の開示

この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55（*Trichoderma harzianum* SK-55）を通気培養により培養させると共に、厚膜孢子生成条件を付与す

ることにより、多量の厚膜胞子の生成に成功したのである。

具体的には、SK-55の菌糸体を椎茸等の培地と近似した培地に接種し、通気攪拌して培養すると共に、栄養分消費時に外部刺激を強くして厚膜胞子化を促進させた後、遠心分離法その他の手段によって培地と、菌糸体、分生子及び厚膜胞子とを分離することを特徴とした厚膜胞子及びその製造方法である。

前記椎茸等の培地と近似した培地とは、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを主材料とし、これに必要な微量成分（例えば硫酸マグネシウム、塩化カルシウムなど）を加えたものであって、この場合にpHは無調整としている。

また、前記培養において、温度は27℃～29℃、通気量は0.3vvm、接種後の攪拌数は100～200rpm、接種種量は0.5～0.8%であって、pH調整は行っていない。

即ちトリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、培養し、分生子入りの厚膜胞子を得たことを特徴とする厚膜胞子であり、培養培地は、グルコース2.0%～3.5%（質量）、酵母エキス0.3%（質量）、ポリペプトン0.3%（質量）、硫酸マグネシウム0.05%（質量）、塩化カルシウム0.05%（質量）及び消泡剤0.001%（質量）としたものである。

次に方法の発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、適温に保ちつつ通気と攪拌を継続して菌糸体の増殖を図り、ついで攪拌強度を高めて胞子形成を促進させつつ、通気培養を継続させた後、前記培養液と生成した菌糸体、分生子及び厚膜胞子とを分離することを特徴とした厚膜胞子の製造方法である。また適温は27℃～29℃とし、通気量は0.3vvmとし、攪拌数は100～200rpmとし、接種種量は0.7%とするものであり、培地内のグルコース消費後、攪拌数を15～30%増加すると共に通気培養を継続するものである。

前記発明における培地はpH調整していなくても、菌糸体の増殖に支障はない。

前記発明において、培養温度を27℃～29℃にしたのは、トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体（以下SK-55という）の増殖適温だからで

ある。

前記発明において培地から菌糸体及び厚膜胞子を回収するには、通常菌糸体の分離に使用されている遠心分離機又は圧搾濾過法を使用する。

この発明において、培養後2日後位から攪拌数(振盪数)を早くするのは、菌糸体の増殖について困難性を増し、厚膜胞子の生成を促進させる為である。主としてグルコースを消費尽した頃(2日後)攪拌数を増加させれば、SK-55の菌糸体が自衛上厚膜胞子化すると判断した為であるが、実際上もそのようになって厚膜胞子の生成が促進された。

前記発明における培地容量は100ml、通気量は0.3vvmであって、容量が多くなれば、当然通気量も大きくなる。

この発明によれば、熱耐性が優れかつ均質のSK-55の厚膜胞子を多量に得ることができる。

この発明の方法によれば、SK-55の厚膜胞子を多量生産できる効果がある。

15

#### 図面の簡単な説明

第1図は、この発明の実施例の培養時におけるグルコースと日数のグラフである。第2図は、同じく培養日数と、厚膜胞子数などのグラフである。第3図は、同じく他の実施例の培養日数と、厚膜胞子数などのグラフである。

20

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 【実施例1】

この発明の実施例を説明する。

##### (1) 種培養

25

##### (培地組成)

グルコース	22.0 (g/L)
酵母エキス	3.0 (g/L)
ポリペプトン	3.0 (g/L)
MgSO <sub>4</sub>	0.5 (g/L)

CaCl<sub>2</sub> 0.5 (g/L)

pH 無調整

前記成分 100 ml を容量 200 ml の三角フラスコに入れ、SK-55 を 3 g/L の割合で接種し、28℃で7日間、通気量 0.3 vvm、100 rpm の

5 振盪培養した。

## (2) 主培養

### (培地組成)

グルコース 33.0 (g/L)

酵母エキス 3.0 (g/L)

10 ポリペプトン 3.0 (g/L)

MgSO<sub>4</sub> 0.5 (g/L)

CaCl<sub>2</sub> 0.5 (g/L)

消泡剤 0.1 (g/L)

pH 無調整

15 前記成分 15 リットルを、容量 30 リットルのジャーに入れた培地内へ、前記  
(1) で得た種培養液 100 ml を収容し、温度 28℃、通気量 0.3 vvm、  
200 rpm の振盪培養した。前記培地内のグルコース消費後（培養 2 日後）、  
240 rpm 振盪して孢子形成を促進させ、更に 5 日間通気培養を継続した。前  
記のようにして、7 日間培養後、培養液を遠心分離機で菌糸体、分生子及び厚膜  
20 孢子を分離した。

前記分離物に乾燥助材（珪藻土、ゼオライトなど）を 20～30% 添加し、30～40℃の減圧乾燥機に入れて攪拌しつつ水分 6～12% に乾燥して菌糸体、分生子及び厚膜孢子の混合製品を得た。

前記混合物をホモゲナイザーで無菌的に、菌糸体を破碎処理し、50～60℃  
25 で風乾すれば乾燥製剤ができる。

前記の他、混合物から遠心分離その他の方法により厚膜孢子を分離し、別製の分生子を任意の割合で加入すれば、厚膜孢子と、分生子の割合を使用目的別に規制し、植物別、使用場所別の製剤とすることができる。

前記分離した分生子は  $1.7 \times 10^7$  (CFU/ml) であり、厚膜孢子は 1

前記実施例におけるグルコースの消費状態は図1の通りである。

5

供試菌      ダイコンバーディシリウム黒后病    *verticillium dahliae*

10

対照剤      ベンレート（住友化学工業株式会社製）

## 接種発病方法

15

20

25

【表 1】

表 1 評 価

項 目 供試剤	処理量	発病苗率 (%)	防除効果 (%)
SK-55 分生子製剤	10 g/m <sup>2</sup>	52.0	27
	30 g/m <sup>2</sup>	61.5	14
	100 g/m <sup>2</sup>	22.2	69
SK-55 厚膜胞子製剤	10 g/m <sup>2</sup>	60.9	15
	30 g/m <sup>2</sup>	52.4	27
	100 g/m <sup>2</sup>	8.8	88
SK-55 分生子原末	10 g/m <sup>2</sup>	59.9	17
	30 g/m <sup>2</sup>	21.7	70
	100 g/m <sup>2</sup>	4.2	94
ベンレート		23.8	67
無処理		71.4	

試験日：菌接種、薬剤処理1999年11月19日、播種1999年11月22日、

5 調査2000年1月11日

結 果：無処理区の発病は高かった。分生子製剤、厚膜胞子製剤では、使用量  
10 g/m<sup>2</sup>と、30 g/m<sup>2</sup>での効果は確認できなかったが、100 g/m<sup>2</sup>で  
は対照剤ベンレートと同等の活性が認められた。

更に分生子原末では、菌量が多いので30 g/m<sup>2</sup>、100 g/m<sup>2</sup>で顕著な防  
10 除効果が認められた。

### 【実施例 2】

この発明の他の実施例について説明する。

#### (1) ジャー培養（培地組成）

グルコース 3.3%

15 ポリペプトン 0.3%



硫酸マグネシウム 0.05%

塩化カルシウム 0.05%

消泡剤 0.01%

pH 無調整

5 シード量 0.7%

条件：温度 28℃

撹拌 200 rpm

通気量 0.3vvm

10 上記培地で液体通気（撹拌）状態で3日間通気培養し、3日経過後1リットル  
サンプリングして、容量500mlの三角フラスコに100ml添加し、下記条  
件で7日間培養（全部で10日間培養）し、前記ジャーで継続培養したものと比  
較した所、表2の結果を得た。

【表2】

15

表2 培養比較

試験区	厚膜孢子数( $\times 10^7$ /ml)	孢子率 (%)
ジャー培養	5.0	100
ジャー培養 20℃	3.5	70
ジャー培養 35℃	1.8	36
1% $\text{CaCO}_3$ 添加	2.2	44
pH5 調整区	0.00033	0.007
pH9 調整区	6.0	120

トーマ血球計により厚膜孢子のみを計測

(イ) 孢子化の温度条件は、培養温度（28℃）が最適と思われる。

(ロ) 最近の孢子形成と異なり、カルシウムの添加効果はない。

20 (ハ) 厚膜孢子の形成は、菌体の自己消化酵素との関係が推定され、アルカリ側  
で若干の増加傾向が見られた。

(ニ) 培養液の pH を 5 に調整した区で極端に孢子化が悪く、自己消化酵素との

関係を裏付けられている。

(ホ) ジャー培養の孢子濃度  $5 \times 10^7 / \text{ml}$  で再現性があり、糖切れ後の pH 調整で孢子率は促進されるが、 $1 \times 10^8 / \text{ml}$  が液体培養の限界の可能性がる。

- 5 (2) 培養は  $28^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ rpm}$ 、 $0.3 \text{ vvm}$ 、 $0.2 \text{ kg/cm}^2$  で行い、9 日以降  $20^\circ\text{C}$ 、 $60 \text{ rpm}$  で行った所、表 3 の結果を得た。

【表 3】

表 3 培養比較

培養日数	pH	糖濃度 (%)	溶存酸素 (ppm)	菌体濃度 (%)	総孢子数 ( $\times 10^7 / \text{ml}$ )	死孢子数 ( $\times 10^7 / \text{ml}$ )
0	6	3.1	8.3			
1			0			
3	4.6	0	0			
7	8.2		8.6		39	7.5
9	8.1				52	1.6
12	8.1		6.1	9	27	0.5
15	8.0		6.3	10	38	0.5
細胞が 処理			0		550	8.0

10

前記実施例によれば、厚膜孢子数は、培養 7 日目でピーク ( $4 \times 10^7 / \text{ml}$ ) で以降増加は見られなかった (図 2)。2 回目のサンプルは  $490 \text{ ml}$  をホモゲナイズ処理 ( $10000 \text{ rpm}$ 、10 分間) による死細胞 (厚膜孢子) は、1.0% で安定していたので、ホモゲナイズ処理について死細胞を考慮に入れなく  
15 ても良いと思われる。前記ホモゲナイズ処理後  $490 \text{ ml}$  をとって厚膜孢子数を調査した所、 $5.5 \times 10^8 / \text{ml}$  であった。

前記厚膜孢子的使用時の濃度は、 $5 \times 10^6 / \text{ml}$  で効果を発揮することが認められるので、使用時に約 100 倍に薄めると良いと思われる。

(3) 培養は  $28^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{rpm}$ 、 $0.3\text{vvm}$ 、 $0.2\text{kg}/\text{cm}^2$ で行い、10日以降 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $60\text{rpm}$ で行った所、表4の結果を得た(図3)。

【表4】

表4 比較表

培養日数	pH	糖濃度 (%)	溶存酸素 (ppm)	菌体濃度 (%)	総孢子数 ( $\times 10^7/\text{ml}$ )	死孢子数 ( $\times 10^7/\text{ml}$ )
0	6	3.1	5.8			
3	4.6	0	0.5			
7	8.2		4.2	16	42	1.0
10	8.4		2.9	7	40	1.1
14	8.2		0		29	1.0
19	8.4		0	9	33	0.5
細胞が 処理			0		190	5.4

前記実施例によれば、厚膜孢子数は、培養9日目でピーク( $5 \times 10^7/\text{ml}$ )で、以降増加は見られない(図3)。2回目のサンプル490mlをホモゲナイズ処理( $10000\text{rpm}$ 、10分間)による死細胞(厚膜孢子)は1.5%で安定していたので、ホモゲナイズ処理について、死細胞を考慮に入れなくても良いと思われる。但しホモゲナイズ処理後490mlをとって厚膜孢子数を調査した所、 $5.5 \times 10^8/\text{ml}$ であった。

前記厚膜孢子的使用時の濃度は $5 \times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ で効果を発揮することが認められるので、使用時に約100倍に薄めると良いと思われる。

#### (使用例)

トリコデルマ ハルジアナム SK-55の厚膜孢子、 $5.5 \times 10^8/\text{ml}$ を200倍に希釈し、切断した種いも1ヶ当たり20ml平均で噴霧又は浸漬し、乾燥後植え付けた。

収穫時に、慣行区と厚膜孢子区夫々10株を無作為に採取し、計量した所、表

5の結果を得た。

【表 5】

表 5 成績表

区分	S - 3 L		2 S ~ 2 S 以下		重量合計 (g)
	個数	重量 (g)	個数	重量 (g)	
慣行区	5 6	7, 2 9 0	1 7	3 6 0	7, 6 5 0
厚膜孢子区	7 2	8, 3 7 0	3 9	1, 1 3 0	9, 5 0 0

5

前記のように、増収率は124%であった。前記においては、処理後の乾燥不十分であること、枯衰剤の処理を7日～10日遅らせることにより更なる増収が見込まれた。これは当初の発育が遅れたが、同日収穫した為であった。

## 請 求 の 範 囲

1. トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、培養し、分生子入りの厚膜胞子を得たことを特徴とする厚膜胞子。
2. 培養培地は、グルコース2.0%～3.5%（質量）、酵母エキス0.3%（質量）、ポリペプトン0.3%（質量）、硫酸マグネシウム0.05%（質量）、塩化カルシウム0.05%（質量）及び消泡剤0.001%（質量）としたことを特徴とする請求項1記載の厚膜胞子。
- 10 3. トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、適温に保ちつつ通気と攪拌を継続して菌糸体の増殖を図り、ついで攪拌強度を高めて胞子形成を促進させつつ、通気培養を継続させた後、前記培養液と生成した菌糸体、分生子及び厚膜胞子とを分離することを特徴とした厚膜胞子の製造方法。
- 15 4. 適温は27℃～29℃とし、通気量は0.3vvmとし、接種後の攪拌数は100～200rpmとし、接種種量は0.7%とすることを特徴とした請求項3記載の厚膜胞子の製造方法。
5. 培地内のグルコース消費後、攪拌数を15～30%増加すると共に通気培養を継続することを特徴とした請求項3又は請求項4記載の厚膜胞子の製造方法
- 20 。

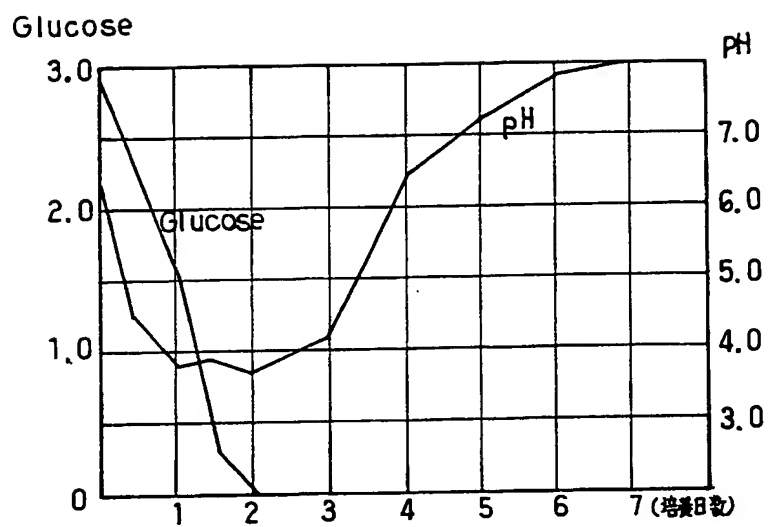
•

•

•

•

第1図

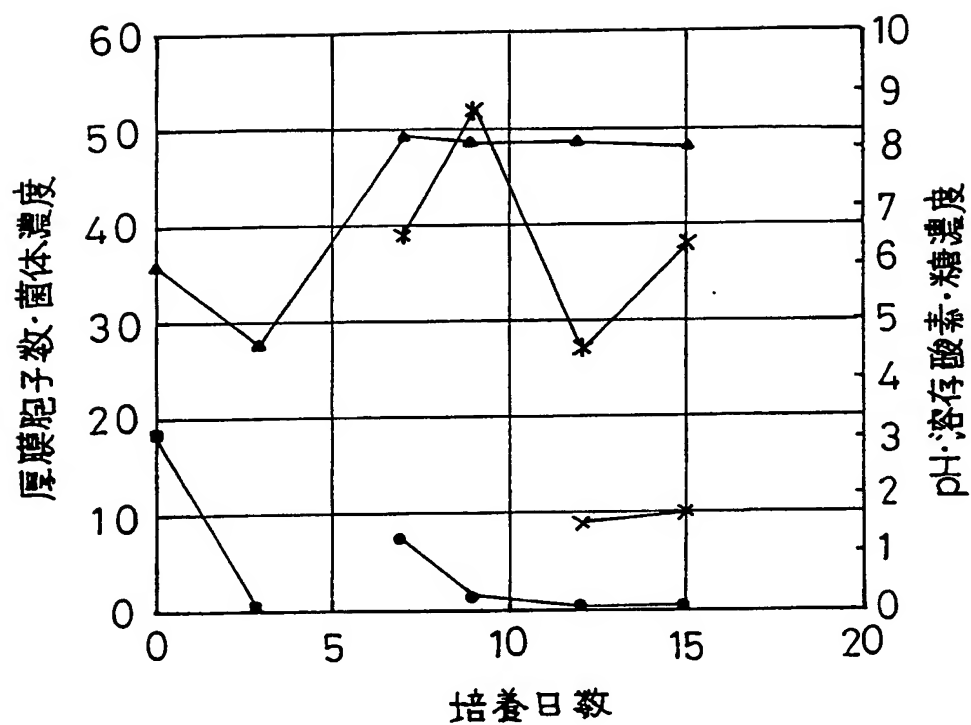






## 第2図

厚膜胞子の培養推移

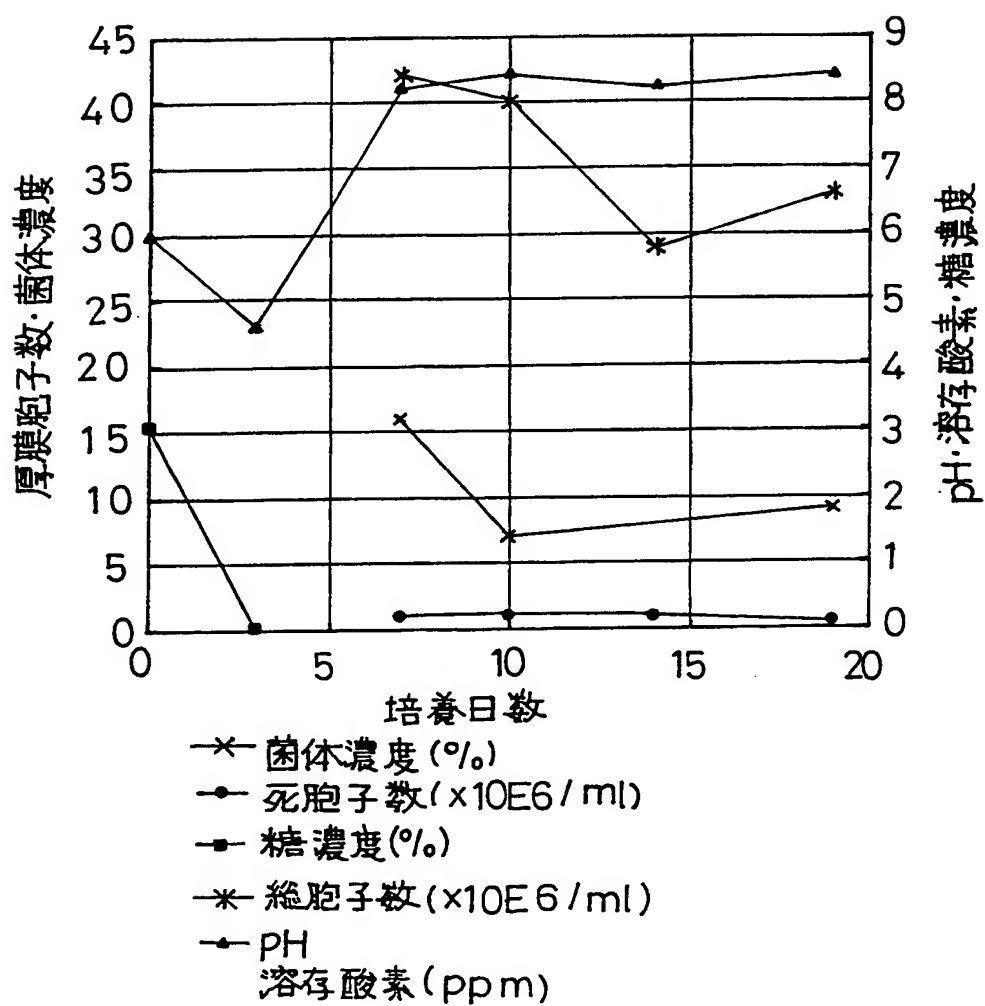


- x— 菌体濃度 (%)
- 死胞子数 ( $\times 10^6$ /ml)
- 糖濃度 (%)
- \*— 総胞子数 ( $\times 10^6$ /ml)
- ▲— pH  
溶存酸素 (ppm)



## 第3図

厚膜胞子の培養推移





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02772

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 1/14, 3/00 // (C12N 1/14, C12R 1:885), (C12N 3/00, C12R 1:885)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 1/14, 3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JP, 2000-93167, A (Kabushiki Kaisha Obiken), 04 April, 2000 (04.04.00) (Family: none)	1-5
P,A	JP, 2001-172112, A (Yasuharu SASAKI), 26 June, 2001 (26.06.01) (Family: none)	1-5
X	JP, 11-341981, A (Kabushiki Kaisha Obiken), 14 December, 1999 (14.12.99) (Family: none)	1-5
Y	US, 5422107, A (Hokkaido Green Kosan Inc.), 06 June, 1995 (06.06.95), & JP, 6-192028, A & EP, 837139, A2	1-5
Y	JP, 11-279015, A (Kabushiki Kaisha Shinkinrui Kinou Kaihatsu Kenkyusho), 12 October, 1999 (12.10.99) (Family: none)	1-5
Y	JP, 7-303481, A (Japan Tobacco Inc.), 21 November, 1995 (21.11.95) (Family: none)	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 June, 2001 (27.06.01)Date of mailing of the international search report  
10 July, 2001 (10.07.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02772

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 383201, A (BASF Aktiengesellschaft), 22 August, 1990 (22.08.90), & JP, 2-245178, A & DE, 3904710, A & US, 5084272, A	1-5
Y	US, 4837155, A (Bio-Technology General Corporation), 06 June, 1989 (06.06.89), & IL, 68523, A	1-5
Y	J. A. LEWIS et al., "Chlamyospore formation by Trichoderma spp. in natural substrates", Can. J. Microbiol., (1984), Vol.30, No.1, pages 1 to 7	1-5
A	JP, 9-087122, A (Hokkaido Green Kosan K.K.), 31 March, 1997 (31.03.97) (Family: none)	1-5
A	JP, 7-101815, A (Akimasa KUBOTA), 18 April, 1995 (18.04.95) (Family: none)	1-5
A	EP, 466133, A (Peri Development Applications (1985) Ltd.), 15 January, 1992 (15.01.92), & JP, 6-78753, A & US, 5238690, A & US, 5266316, A	1-5
A	JP, 62-115274, A (Ajinomoto Co., Inc.), 26 May, 1987 (26.05.87) (Family: none)	1-5
A	EP, 124388, A (Les Produits Organiques du Santerre Orsan), 07 November, 1984 (07.11.84), & JP, 59-210883, A & FR, 2545099, A	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl' C12N 1/14, 3/00// (C12N 1/14, C12R 1:885) (C12N 3/00, C12R 1:885)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl' C12N 1/14, 3/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 2000-93167, A (株式会社応微研) 4. 4月. 2000 (04. 04. 00) (ファミリーなし)	1-5
P, A	JP, 2001-172112, A (佐々木 康晴) 26. 6月. 2001 (26. 06. 01) (ファミリーなし)	1-5
X	JP, 11-341981, A (株式会社応微研) 14. 12月. 1999 (14. 12. 99) (ファミリーなし)	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	27. 06. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先	日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

10.07.01



4N 2937

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US, 5422107, A (Hokkaido Green Kosan Inc.) 6. 6月. 1995 (06. 06. 95) & JP, 6-192028, A & EP, 837139, A2	1-5
Y	JP, 11-279015, A (株式会社真菌類機能開発研究所) 12. 10月. 1999 (12. 10. 99) (ファミリーなし)	1-5
Y	JP, 7-303481, A (日本たばこ産業株式会社) 21. 11月. 1995 (21. 11. 95) (ファミリーなし)	1-5
Y	EP, 383201, A (BASF Aktiengesellschaft) 22. 8月. 1990 (22. 08. 90) & JP, 2-245178, A & DE, 3904710, A & US, 5084272, A	1-5
Y	US, 4837155, A (Bio-Technology General Corp.) 6. 6月. 1989 (06. 06. 89) & IL, 68523, A	1-5
Y	J. A. LEWIS et al. "Chlamydospore formation by Trichoderma spp. in natural substrates.", Can. J. Microbiol. (1984) Vol. 30, No. 1, p. 1-7	1-5
A	JP, 9-087122, A (株式会社北海道グリーン興産) 31. 3月. 1997 (31. 03. 97) (ファミリーなし)	1-5
A	JP, 7-101815, A (久保田 昭正) 18. 4月. 1995 (18. 04. 95) (ファミリーなし)	1-5
A	EP, 466133, A (PERI DEVELOPMENT APPLICATIONS (1985) LTD.) 15. 1月. 1992 (15. 01. 92) & JP, 6-78753, A & US, 5238690, A & US, 5266316, A	1-5
A	JP, 62-115274, A (味の素株式会社) 26. 5月. 1987 (26. 05. 87) (ファミリーなし)	1-5
A	EP, 124388, A (Les Produits Organiques du Santerre Orsan) 7. 11月. 1984 (07. 11. 84) & JP, 59-210883, A & FR, 2545099, A	1-5



B P US

P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 1406PCT2000	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 1 / 0 2 7 7 2	国際出願日 (日.月.年) 3 0 . 0 3 . 0 1	優先日 (日.月.年) 3 1 . 0 3 . 0 0
出願人 (氏名又は名称) 佐々木 康晴		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

